昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*, December 2005, 48(6): 866 - 870 ISSN 0454-6296

保幼激素类似物对斜纹夜蛾核多角体病毒增殖的影响

刘永平[1], 王方海[1], 苏志坚[2], 李广宏[1*], 庞 义[1]
(1. 中山大学昆虫研究所, 生物防治国家重点实验室, 广州 510275;
2. 暨南大学药学院, 广州 510632)

摘要: 分别用 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7, 1×10^8 PIBs/mL 4 种浓度的斜纹夜蛾核多角体病毒(SpltNPV)感染斜纹夜蛾末龄幼虫(第 6 龄), 并于同龄期以 10 μg/头的保幼激素类似物(JHA) methoprene 分别对各感染组进行点滴处理, 以研究 JHA 对 SpltNPV 增殖的影响。研究表明, 与对照组相比各不同浓度处理组病毒总产量分别提高 227.06%、128.71%、52.62%、33.15%, 平均单头病毒含量分别提高 49.15%、48.40%、36.40%和 31.11%, 病毒感染死亡率分别提高 119.21%、52.72%、12.64%和 1.12%。其中以 1×10^7 PIBs/mL 感染再经 JHA 处理的病毒总产量和平均单头病毒含量最高, 分别为 $1\ 701.8\times10^8$ PIBs 和 60.1×10^8 PIBs。各处理组的病毒总产量和平均单头病毒含量均显著高于其对照组。在此基础上, 进一步研究了 JHA 对染毒与未染毒宿主消化生理的影响。结果表明, JHA 处理不仅延长了 6 龄幼虫的寿命, 增加了其取食量, 而且还显著提高了幼虫的食物转化率和病毒产量。

关键词: 斜纹夜蛾; 保幼激素类似物; methoprene; 斜纹夜蛾核多角体病毒; 增殖; 消化生理
中图分类号: Q965.8 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2005)06-0866-05

Effect of juvenile hormone analogues on multiplication of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus

LIU Yong-Ping[1], WANG Fang-Hai[1], SU Zhi-Jian[2], LI Guang-Hong[1*], PANG Yi[1] (1. Institute of Entomology, State Key Laboratory of Biocontrol, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510275, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: The influences of juvenile hormone analogues (JHA) on multiplication of *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus were studied. The early 6th instar larvae of *Spodoptera litura* were infected with four concentrations of SpltNPV, 5×10^6, 1×10^7, 5×10^7 and 1×10^8 PIBs/mL, respectively, and then treated with 10 μg methoprene (a JHA) per larva. The results indicated that the total virus yield of the four concentration treatments with virus and methoprene increased by 227.06%, 128.71%, 52.62% and 33.15% than that of the control with virus and acetone, the mean yield per larva increased by 49.15%, 48.40%, 36.40% and 31.11% and the mean mortality increased by 119.21%, 52.72%, 12.64% and 1.12%, respectively. The greatest virus yield was obtained when the larvae were infected by 1×10^7 PIBs/mL and then treated with 10 μg methoprene per larva, and the total virus yield and the mean virus yield per larva were $1\ 701.8\times10^8$ PIBs and 60.1×10^8 PIBs respectively. The virus yield of every treated group was significantly greater than that of the control group. Furthermore, the effects of methoprene on digestive physiology of infected and non-infected host were also studied. The results showed that not only the life duration and food consumption of 6th instar larvae were increased, the food conversion efficiency and virus yield of the larvae treated with methoprene were also increased significantly.

Key words: *Spodoptera litura*; juvenile hormone analogue; methoprene; SpltNPV; multiplication; digestive physiology

斜纹夜蛾核多角体病毒(*Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus, SpltNPV)是斜纹夜蛾种群密度的重要调节因子。自 1912 发现该病毒, Abul-Nasr (1959)确定为核型多角体病毒后, 国内外就该病毒

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170628); 广东省科技攻关项目(2003C20509); 肇庆市科技项目(203301)
作者简介: 刘永平, 男, 1977 年生, 硕士, 山西大同人, 研究方向为昆虫生理与病理, E-mail: ypliu321@yahoo.com.cn
* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: lsslgh@zsu.edu.cn
收稿日期 Received: 2005-04-24; 接受日期 Accepted: 2005-09-13

的形态、致病性和田间应用等作了大量研究（戴冠群，1973）。经多年研究，我国率先成功研制出了斜纹夜蛾核多角体病毒杀虫剂可湿性粉剂"虫瘟一号"，并实施产业化生产（陈其津等，1998）。但在产业化生产过程中，如何进一步提高斜纹夜蛾核多角体病毒增殖效率，从而有效降低生产成本已成为该病毒生产过程中亟待解决的问题。

保幼激素激素类似物（juvenile hormone analogues，JHA）是一类人工合成并具有保幼激素活性的化合物，其主要功能是抑制昆虫发育和变态。用 JHA 处理昆虫幼虫，可妨碍幼虫发生变态，延长幼虫期甚至产生超龄幼虫。早在 20 世纪 70 年代，我国就建立了用 JHA 处理家蚕增加产丝量的技术（包建中和古德祥，1998）。近年来，王厚伟等（2001）研究发现 JHA 能促进家蚕杆状病毒系统的基因表达，而有关 JHA 对斜纹夜蛾核多角体病毒增殖的影响目前尚未见报道。鉴于此，我们研究了 JHA 对斜纹夜蛾核多角体病毒增殖的影响；同时考虑到 JHA 延长幼虫发育历期这一事实，进一步研究了 JHA 对斜纹夜蛾幼虫取食和消化的影响，以确定 JHA 提高斜纹夜蛾核多角体病毒增殖效率的真实程度，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　供试昆虫：斜纹夜蛾 *Spodoptera litura* 幼虫由本实验室饲养室提供，为人工饲料饲养的健康幼虫。人工饲料按陈其津等（2000）报道的配方配制。饲养温度 27～28℃，光周期为 L12∶D12。

1.1.2　病毒：斜纹夜蛾核多角体病毒为广州分离株，由本实验室保存。

1.1.3　激素与指示剂：本试验使用的保幼激素类似物为 methoprene（又名 ZR-515），购自 Fluka 公司，用丙酮稀释至 1 μg/μL 待用。Y_2O_3 为 Sigma 公司产品，分子量 225.81。

1.2　实验方法

1.2.1　病毒感染、JHA 处理及多角体病毒计数：均匀切取一定大小的饲料（幼虫 12 h 内吃完），放入塑料小罐（Φ3 cm×5 cm）中，用微量加样器吸取斜纹夜蛾核多角体病毒感染液 10 μL，均匀滴加于饲料表面；然后在每个管中接入末龄（6 龄）刚蜕皮幼虫 1 头，27±1℃下取食感染。待幼虫取食完染毒饲料后，用微量注射器向每头幼虫体表滴加 methoprene 10 μL，并加入未染毒饲料继续饲养。每天更换饲料，逐日检查活虫数和病毒感染死亡虫数。用定量蒸馏水清洗和收集当日死虫，4℃保存，留待多角体病毒计数。分别将各处理每日收集的病死虫液匀浆、稀释，用血球计数板计数。

1.2.2　不同剂量 methoprene 对斜纹夜蛾 6 龄幼虫历期的影响：用不同剂量的 methoprene 点滴 6 龄初幼虫，每剂量组 10 头虫，以点滴相同剂量的丙酮溶液作对照。观察 methoprene 对斜纹夜蛾幼虫生长发育的影响，以确定其有效的使用范围。

1.2.3　Methoprene 对不同浓度病毒感染的 6 龄幼虫体内病毒增殖的影响：分别用 5×10^6、1×10^7、5×10^7、1×10^8 PIBs/mL 4 种浓度的病毒液感染 6 龄刚蜕皮幼虫后，再用 10 μL methoprene 点滴处理，以点滴相同剂量的丙酮溶液作对照。每处理 30 头虫，重复 3 次。感染 10 天后，测定幼虫的病毒感染死亡率、平均单头幼虫病毒含量和病毒总产量（以每组全部死亡幼虫测定，3 次重复取平均值）。

1.2.4　Methoprene 对斜纹夜蛾 6 龄幼虫取食和消化的影响：参照田丽霞等（2002）报道的方法进行。钇原素用 IRIS Advantage（HR）全谱直读等离子体原子发射光谱仪进行测定。设病毒组、保幼激素组、保幼激素+病毒组和对照 4 组试验，每组 10 头虫，重复 3 次。保幼激素+病毒组以 1×10^7 PIBs/mL 病毒液 10 μL 饲喂 6 龄刚蜕皮幼虫，取食完毕后，每头幼虫滴加 methoprene 10 μL；保幼激素组每头幼虫滴加 methoprene 10 μL；病毒组每头幼虫饲喂 1×10^7 PIBs/mL 病毒液 10 μL，取食完毕后，每头幼虫滴加 10 μL 丙酮溶液；以点滴相同剂量丙酮溶液作对照。以未染毒饲料继续饲养。每天分别称取各幼虫体重，并分别收集每头幼虫的粪便。收集的粪便先在 80℃烘干，再在 106℃下烘 4 h，称重，保存于干燥器中留待分析测试。按以下公式计算有关的指标：

Y_2O_3 含量＝测量值（mg/L）×定容体积（L）×10^{-3}×Y_2O_3 分子量（225.81）/［2Y 分子量（177.8118）×取样重（g）］×100%；

取食量＝（粪便中 Y_2O_3 含量×粪便重量/饲料中 Y_2O_3 含量）×100%；

食物消化率＝［（粪便中 Y_2O_3 含量－饲料中 Y_2O_3 含量）/粪便中 Y_2O_3 含量］×100%；

食物转化率＝（虫体增重/取食量）；

平均每克虫尸病毒含量＝（平均单头虫病毒含量（PIBs）/死亡前一天平均虫体重（g））×100%。

2 结果与分析

2.1 不同剂量 methoprene 对斜纹夜蛾 6 龄幼虫历期的影响

由表 1 可知,6 龄幼虫的历期随 methoprene 处理剂量的增加而逐渐延长,当达到 10 μL/头(即 10 μg/头)时,延长历期基本达到峰值;处理剂量大于 10 μg/头,幼虫生长速度减慢,体重轻,进入预蛹、蛹期时的畸形数和死亡数明显增加。因此考虑到既要尽量延长幼虫历期,又要保持幼虫正常生长发育,作者认为以 10 μg/头的处理剂量为佳。

表 1 不同剂量 methoprene 对斜纹夜蛾 6 龄幼虫历期的影响

Table 1 The effect of methoprene dose on duration of 6th instar larvae of *Spodoptera litura*

剂量(μg/头) Methoprene dose (μg/larva)	历期(天) Duration (d)	剂量(μg/头) Methoprene dose (μg/larva)	历期(天) Duration (d)
丙酮 Acetone (CK)	2 – 3	7	14 – 15
1	4 – 5	10	18 – 19
3	7 – 8	12	18 – 20
5	11 – 12	15	18 – 20

表 2 Methoprene 对不同浓度病毒感染的 6 龄幼虫体内病毒增殖的影响

Table 2 The effect of methoprene on multiplication of SpltNPV in 6th instar larvae of *Spodoptera litura* treated with different concentration of virus

病毒接种浓度 Virus concentration inoculated (10^7 PIBs/mL)	处理 Treatment	病毒总产量 Total virus yield (10^9 PIBs)	平均单头病毒含量(10^9 PIBs/头) Mean virus yield per larva (10^9 PIBs)	感染死亡率 Mortality (%)
0.50	保幼激素 Methoprene	111.33 ± 3.28 eC	5.88 ± 1.31 aA	63.33 ± 3.33 dC
	丙酮 Acetone (CK)	34.04 ± 0.31 hF	3.94 ± 0.15 cC	28.89 ± 2.22 eD
1.00	保幼激素 Methoprene	170.18 ± 4.50 aA	6.01 ± 0.71 aA	93.33 ± 3.33 bB
	丙酮 Acetone (CK)	74.41 ± 0.56 gE	4.05 ± 0.30 cC	61.11 ± 3.33 dC
5.00	保幼激素 Methoprene	162.62 ± 1.50 bB	5.50 ± 0.89 abA	100.00 ± 0.00 aA
	丙酮 Acetone (CK)	106.55 ± 3.84 fD	4.03 ± 0.56 cC	87.78 ± 4.44 cB
10.00	保幼激素 Methoprene	156.98 ± 4.58 cB	5.21 ± 0.91 bB	100.00 ± 0.00 aA
	丙酮 Acetone (CK)	117.89 ± 3.19 dC	3.97 ± 0.73 cC	98.89 ± 1.11 aAB

同列不同小写字母代表组间差异显著($P<0.05$),不同大写字母代表组间存在极显著差异($P<0.01$)。下同。
Data with different small and capital letters in the same column are significantly different at $P<0.05$ and at $P<0.01$, respectively. The same below.

2.2 Methoprene 对不同浓度病毒感染的 6 龄幼虫体内病毒增殖的影响

由表 2 可知,分别用 5×10^6、1×10^7、5×10^7、1×10^8 PIBs/mL 4 种浓度感染试虫,其保幼激素处理组的病毒总产量、平均单头病毒含量和病毒感染死亡率均极显著高于对照组,其中处理组各浓度的病毒总产量分别比对照组提高 227.06%、128.71%、52.62%、33.15%;平均单头病毒含量分别提高 49.15%、48.40%、36.40%、31.11%;病毒感染死亡率分别提高 119.21%、52.72%、12.64% 和 1.12%。说明 methoprene 可有效促进斜纹夜蛾核多角体病毒在其寄主内的增殖。经比较发现,尤以用 1×10^7 PIBs/mL 的浓度感染,再经 methoprene 处理的 6 龄幼虫增殖病毒最多,显著高于其他处理组,其病毒总产量达 $1\ 701.8\times10^8$ PIBs,平均单头病毒含量高达 60.1×10^8 PIBs,病毒感染死亡率为 93.33%。

2.3 Methoprene 对染毒斜纹夜蛾 6 龄幼虫取食量的影响

由图 1 可知,病毒组与对照组的幼虫取食量在第 1 天最多,此后持续下降,其中对照组幼虫第 3 天停食转入化蛹;而保幼激素组和保幼激素 + 病毒组的幼虫取食量第 2 天最多(造成这一现象的原因可能是由于第 1 天保幼激素处理后的几个钟头内幼虫受 methoprene 影响活力下降所致),第 3 天取食量下降,但第 4 天取食量又较前一天有所增加,此后取食量持续下降。经方差分析,各处理组平均单头幼虫总取食量与对照组差异极显著,其中保幼激素组、保幼激素 + 病毒组和病毒组的总取食量分别比对照组高 100.00%、70.97%、58.06%,说明保幼激素处理和病毒感染均可促进幼虫取食,而保幼激素处理又比病毒感染更明显。

2.4 Methoprene 对染毒斜纹夜蛾 6 龄幼虫体重的影响

从图 2 可知,保幼激素组、保幼激素 + 病毒组、病毒组的平均最大体重均显著高于对照组,其分别比对照组高 60.88%、51.36% 和 34.80%。

2.5 Methoprene 对染毒和未染毒 6 龄斜纹夜蛾幼虫消化生理的影响

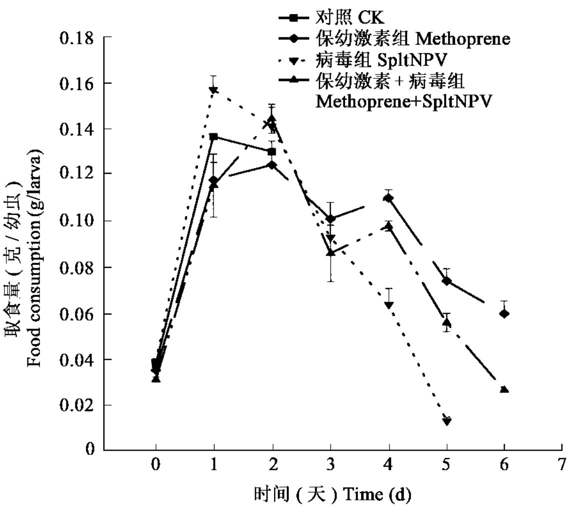


图 1　Methoprene **对感染的斜纹夜蛾** 6 **龄幼虫取食量的影响**

Fig. 1　The effect of methoprene on food consumption of 6th instar infected larvae of *Spodoptera litura*

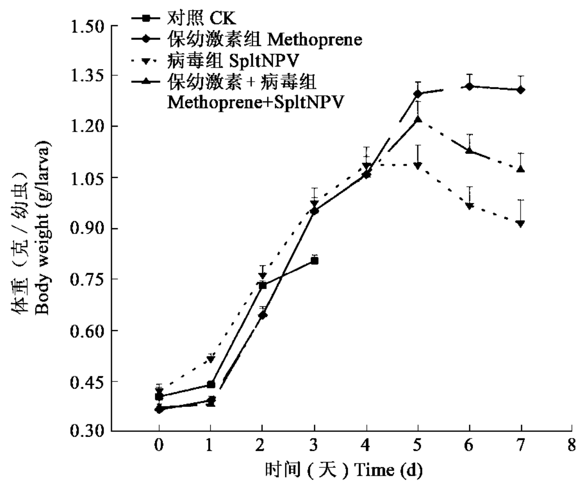


图 2　Methoprene **对感染的斜纹夜蛾** 6 **龄幼虫体重的影响**

Fig. 2　The effect of methoprene on body weight of 6th instar infected larvae of *Spodoptera litura*

表 3　**Methoprene** 对染毒和未染毒 **6** 龄斜纹夜蛾幼虫消化生理的影响

Table 3　The effect of methoprene on digestive physiology of infected and non-infected 6th instar larvae of *Spodoptera litura*

处理组 Treatment	食物消化率 Digestion rate（%）	食物转化率 Food conversion efficiency（%）	每克虫尸病毒含量 Viruse yield per gram of larval body（10^9 PIBs）
丙酮 Acetone（CK）	40.49 ± 0.49	32.18 ± 1.95 cB	–
保幼激素 Methoprene	40.54 ± 0.73	36.16 ± 2.91 bA	–
病毒 SpltNPV	40.89 ± 0.44	32.15 ± 1.72 cB	4.62 ± 0.30 b
保幼激素＋病毒 Methoprene＋SpltNPV	40.99 ± 0.83	40.82 ± 4.45 aA	5.53 ± 0.31 a

斜纹夜蛾 6 龄幼虫经不同处理组处理后，各处理组间的食物消化率无明显差异，但食物转化率差异显著。其中保幼激素组和保幼激素＋病毒组的食物转化率与对照组和病毒处理组之间差异极显著，而保幼激素组和保幼激素＋病毒组之间差异显著（见表 3）。说明保幼激素不仅能提高健康幼虫而且也能提高病毒感染幼虫的食物转化率。病毒组与保幼激素＋病毒组相比较，在每克虫尸病毒含量方面存在显著差异，表明保幼激素促进了病毒的增殖。

3　讨论

病毒增殖是病毒杀虫剂大规模生产的重要环节之一。就此环节而言，主要应提高病毒的感染死亡率和单头病毒含量，两方面相辅相成，不可偏颇（黄亚欣，1995）。试验表明，在正常感染条件下，斜纹夜蛾的最适感染龄期为 5 龄初（张文军和古德祥，1996），末龄（6 龄）感染死亡率极低。用 5 龄初幼虫染毒，感染幼虫虽可蜕皮进入末龄并继续发育，但随着感染时间的推移，幼虫取食量将逐渐减少，一般至末龄中期停止取食，这就使得感染幼虫无法在末龄中后期进一步摄取大量营养物供病毒增殖之用，从而限制了病毒产量的进一步提高。鉴于此，我们用斜纹夜蛾末龄幼虫进行感染并点滴 methoprene，以期增加病毒产量。试验表明，methoprene 处理末龄幼虫后，4 个不同病毒感染浓度处理组的病毒总产量、平均单头病毒含量及感染死亡率均极显著高于对照组，说明 methoprene 可有效提高斜纹夜蛾核多角体病毒的增殖，其有关机理目前正在研究中。

关于 JHA 促进昆虫病毒增殖的机理目前 Zhou 等（2002）和王厚伟等（2001）做了初步研究。Zhou 等研究发现外源保幼激素能显著促进家蚕核多角体病毒极早期基因 *ie*-1 启动子携带的绿色荧光蛋白的转录水平，揭示了保幼激素促进昆虫病毒增殖的一种作用模式。王厚伟等研究发现 ZR-515 可以显著提高感染重组病毒的家蚕 5 龄幼虫体重，而且提高

了植酸酶基因在家蚕幼虫血淋巴单位体积的表达量，试验推断外源基因表达量的提高主要是保幼激素使宿主发病时间延长的结果。该文作者认为保幼激素对病毒的复制有双重影响：一方面在早期能够抑制与病毒复制相关的蛋白的合成，但病毒感染的晚期又能够延长病毒在宿主体内的增殖时间，两方面相互作用的结果使重组杆状病毒外源基因的表达量得到较大提高。本文的试验结果基本与上述结果相符，但未发现 methoprene 能使感染 6 龄斜纹夜蛾幼虫发病时间显著延长的现象。因此，有必要对其作用机制进行进一步探索。

消化生理试验表明，methoprene 处理尽管在一定程度上增加了斜纹夜蛾幼虫的取食量，但却更显著提高了斜纹夜蛾幼虫的食物转化率及病毒增殖效率，说明利用 methoprene 处理斜纹夜蛾幼虫是提高其病毒增殖效率的有效途径之一。但由于本试验所使用的保幼激素类似物为 Fluka 产品，价格较高，因此目前还难以在大规模生产病毒作为杀虫剂上加以应用。但当前我们正在积极寻找商品化且作为杀虫剂的保幼激素类似物，以尽早利用其高效、低成本增殖斜纹夜蛾核多角体病毒。另外，methoprene 是脂溶性物质，通过口服处理尚难实现，而采取点滴工作量又较大。因此，我们拟采取将昆虫直接放入到含有保幼激素类似物的丙酮液中作短时浸泡，以解决病毒生产过程中用保幼激素类似物处理困难的问题，但具体方式有待今后进一步研究。

参考文献（References）

Abul-Nasr S, 1959. Field tests on the use of a polyhedrosis virus disease for the control of the cotton leafworm *Prodenia litura* (F.). *Bull. Soc. Ent. Egypt*, 43: 231 – 241.

Bao JZ, Gu DX, 1998. Chinese Biological Control. Taiyuan: Shanxi Science and Technology Publishing House. 612-614.［包建中，古德祥，1998. 中国生物防治. 太原：山西科学技术出版社. 612 – 614］

Chen QJ, Li GH, Pang Y, 2000. A simple artificial diet for mass rearing of some noctuid species. *Entomological Knowledge*, 37(6): 325 – 327.［陈其津，李广宏，庞义，2000. 饲养五种夜蛾科昆虫的一种简易人工饲料. 昆虫知识，37(6)：325 – 327］

Chen QJ, Pang Y, Li GH, 1998. Insecticide of SlNPV-No.1. *J. Wuhan Univ.* (*Natural Science Edition*), 44(Suppl.): 183.［陈其津，庞义，李广宏，1998. 斜纹夜蛾核多角体病毒杀虫剂——虫瘟一号. 武汉大学学报(自然科学版)，44(杀虫微生物专刊)：183］

Dai GQ, 1973. Preliminary research on the nuclear polyhedrosis virus of the cotton leafworm, *Spodoptera litura* F. in Guangdong district. *Acta Entomologica Sinica*, 16(1): 80 – 89.［戴冠群，1973. 广州地区斜纹夜蛾核多角体病毒的初步研究. 昆虫学报，16(1)：89 – 90］

Huang YX, 1995. Studies on the propagation of the nuclear polyhedrosis virus of the cotton leafworm, *Spodoptera litura* F. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 34(4): 64 – 68.［黄亚欣，1995. 单头饲养斜纹夜蛾增殖 SlNPV 病毒的研究. 中山大学学报(自然科学版)，34(4)：64 – 68］

Tian LX, Liu YJ, Feng J, Liu DH, Liang GY, Du ZY, 2002. Effect of different types of starch on growth, the deposition of mesenteric fat and body composition of *Ctenopharyngodon idellus*. *Journal of Fisheries of China*, 26(3): 247 – 251.［田丽霞，刘永坚，冯健，刘栋辉，梁桂英，杜震宇，2002. 不同种类淀粉对草鱼生长、肠系膜脂肪沉积和鱼体组成的影响. 水产学报，26(3)：247 – 251］

Wang HW, Zhang ZF, Xiao QL, Li WG, He JL, 2001. Insect juvenile hormone enhancing gene expression in silkworm baculovirus vector system. *Chinese Journal of Biotechnology*, 17(5): 590 – 593.［王厚伟，张志芳，肖庆利，李卫国，何家禄，2001. 昆虫保幼激素促进家蚕杆状病毒系统的基因表达. 生物工程学报，17(5)：590 – 593］

Zhang WJ, Gu DX, 1996. Infection threshold of SlNPV to larva of *Spodoptera litura* F. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 35(3): 18 – 22.［张文军，古德祥，1996. SlNPV 对斜纹夜蛾幼虫的侵染阈值. 中山大学学报（自然科学版），35(3)：18 – 22］

Zhou Y, Xiao Q, Zhang Z, He J, Zhang Y, 2002. Foreign insect hormones stimulating the transcription of the *ie*-1 promoter of *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus *in vivo* and *in vitro*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66(7): 1 488 – 1 494.

（责任编辑：吴明宇）